

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER DIE FÄHIGKEIT DER SPORULATION
DER 6 STAMMTYPEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII
BEI VERWENDUNG DES ELLNER-MEDIUMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Hans-Dieter Schick
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1969
Journal-Nr. 657

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

STUDIEN ÜBER DIE FÄHIGKEIT DER SPORULATION
DER 6 STAMMTYPEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII
BEI VERWENDUNG DES ELLNER-MEDIUMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Hans-Dieter Schick
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1969
Journal-Nr. 657

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER DIE FÄHIGKEIT DER SPORULATION
DER 6 STAMMTYPEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII
BEI VERWENDUNG DES ELLNER-MEDIUMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Hans-Dieter Schick
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1969
Journal-Nr. 657

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. K. Bronsch
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell



Tag der Promotion: 12.2.1969

Meiner lieben Frau gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550804_0012

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
E i n l e i t u n g	5
L i t e r a t u r über Sporulationsmedien verschiedener Zusammensetzung	6
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	19
A. Material	19
Stämme und Kultivierung	19
B. Technik	20
1. Nährmedien	20
a) Leber-Leber-Bouillon (LLB)	20
b) Thioglykolat-Medium	20
c) Herstellung des Sporulationsmediums nach ELLNER	20
2. Sporennachweis und Sporenzählung	22
a) Färbung nach RAKETTE	22
b) Zählung der vegetativen Formen und Sporen	22
3. Hitzeresistenzprüfungen	23
C. Ergebnisse	24
1. Sporulationsaktivität von Cl. perfringens-Stämmen Typ A - F im ELLNER-Medium	24
a) Versporung von 9 Stämmen des Cl. perfringens Typ A bei unterschiedlichem pH (7,8 und 8,5)	25
b) Vergleichende Prüfung der Sporenerträge der Stämme B - F bei unterschiedlichem pH (7,8 und 8,5)	28
2. Hitzeresistenzprüfungen bei den Stämmen A - F	31
B e s p r e c h u n g	37
Z u s a m m e n f a s s u n g	43
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	44

E i n l e i t u n g

Das Clostridium (Cl.) welchii bildet selten oder überhaupt keine Sporen, wenn man für die Züchtung die üblichen Nährböden benutzt. Doch gibt es eine umfassende Literatur, welche die Frage, wie sich eine Sporulation erzielen läßt, behandelt und bestimmte Verfahren für eine Induktion der Sporulation empfiehlt.

Auf Grund der Schwierigkeit, eine Sporulation bei den einzelnen Stämmen mit Sicherheit zu erzielen, hat sich das Cl. welchii als Testkeim für die Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln als wenig geeignet erwiesen. Trotzdem hat sich die Notwendigkeit des öfteren ergeben, diesen Keim in Prüfungsversuche von Desinfektionsmitteln mit einzubeziehen und seine Sporen insbesondere auf Abtötung zu prüfen. Außerdem hat auch die Frage oft interessiert, ob das unterschiedliche Verhalten der 6 Stammtypen (A - F) gegenüber Hitzegraden mit der Fähigkeit, Sporen zu bilden, in Zusammenhang stehen könnte.

Mir wurde die Aufgabe zuteil zu prüfen, inwieweit und in welcher Stärke das ELLNER-Medium geeignet ist, bei den in der Natur besonders häufig vorkommenden A-Typen sowie den im Institut vorhandenen Standardtypen A - F eine Sporulation zu induzieren. Weiterhin sollte ich mich mit der Frage beschäftigen, ob Anhaltspunkte für die Annahme gegeben sind, daß Sporulation und Hitzeresistenz voneinander abhängen.

Literatur über Sporulationsmedien verschiedener
Zusammensetzung

Clostridium perfringens (welchii) ist ein ubiquitärer Anaerobier, der im Erdboden, im Staub, im Wasser, in jeder Art von Verunreinigungen und im Darminhalt von Mensch und Tieren gefunden wurde (49). Das *Cl. perfringens* nimmt unter den anaeroben Bazillen eine besondere Stellung ein, da es in den üblichen Nährmedien nicht versporst. Die besonderen Bedingungen, unter denen die Versporung des *Cl. welchii* stattfindet, sind von großem Interesse, weil sie eindringlicher und auffälliger als bei leicht in jedem Kulturmedium versporenden Keimen die Faktoren aufdecken, die bei der Sporenbildung der Keime eine Rolle spielen (3). Die früheste Beschreibung des *Cl. perfringens* (43) vergaß die Sporulation dieses *Bacillus* als ein Charakteristikum einzuschließen, doch etwas spätere Publikationen zeigten die Notwendigkeit auf, spezielle Medien für die erfolgreiche Induktion der Sporulation zu entwickeln (DUNHAM (8), HERTER (20)).

Verbesserte Medien, die Kohle enthielten, zeigten größere Sporenzahlen, aber Zucker wie D-Glukose, Saccharose, Maltose und Laktose wirkten hemmend auf die Sporogenese. *Cl. perfringens* sporulierte in alkalischem Milieu, welches $n/200$ bis $n/50$ NaOH enthielt. Der Zusatz von 0,5 bis 5 % NaCl zum Nährmedium stellte keinen Faktor dar, der die Sporulation beeinflusste, während nicht fermentierbare Kohlehydrate wie Mannitol und Amylodin die Sporulation erhöhten (FITZGERALD (10) u. NOGOUCHI (31)).

SIMONDS (40) stellte fest, daß die Sporenbildung bei *Cl. perfringens* inkonstant ist und sich nur in alkalischem Milieu ereignet, niemals aber in Kulturen mit fermentierbarem Zucker oder freier Säure.

ROBERTSON (37) entwickelte ein Kochfleischmedium, nachdem er entdeckt hatte, daß *Cl. perfringens* nur in einem an Protein reichen, aber an fermentierbaren Kohlehydraten armen Medium Sporen bildet.

TORREY, KAHN u. SALINGER (44) zeigten die Bedeutung der H-Ionenkonzentration für die Sporulation auf. Sie benutzten ein zuckerfreies, gut abgepuffertes flüssiges Medium, welches sich in seiner Reaktion beim Wachstum von *Cl. perfringens* kaum veränderte und befanden den pH 6,8 - 7,0 als optimal für die Sporulation, während der optimale pH-Wert für die vegetative Entwicklung zwischen pH 7,4 - 8,0 lag. Wenn die Reaktion des Nährmediums unter pH 6,6 lag, wurde die Sporulation gehemmt.

Nach ZEISSLER (48) bildet *Cl. welchii* Sporen auf Agar mit 2 - 3 % Na_2CO_3 , welcher kein von diesem Keim angreifbares Kohlehydrat enthält, und in eiweißreichen Nährsubstraten, welche frei von Kohlehydraten sind, die der *Bacillus* zersetzen kann. Bei Gegenwart geeigneter Puffersubstanzen, z.B. Kreide, vermag er auch in anderen Nährsubstraten Sporen zu bilden.

HEADLEE (19) betrachtete ein alkalisches Eimedium als einzig erfolgreiches für die Sporenproduktion.

LEIFSON (24) studierte die Bedingungen der Induktion einer Sporulation bei *Cl. botulinum*, welches analog zum *Cl. perfringens* auch nur bei besonderen Nährbodenverhältnissen sporuliert. Er stellte fest, daß die optimale H-Ionenkonzentration bei pH 6,2 - 6,3 sowie die Abwesenheit von fermentierbaren Kohlehydraten einen entscheidenden positiven Einfluß auf die Sporenbildung hatten. Chloride hatten einen stark hemmenden Einfluß, ebenfalls Nitrate in Konzentrationen von 1 %. Ammonium-Salze und Sulfate besitzen dagegen einen stimulierenden Effekt. *Cl. botulinum* sporulierte nicht, wenn nur Pepton vorhanden war.

Das Hinzufügen von verschiedenen Salzen zum Pepton zeigt, daß Ammonium- und Phosphat-Ionen eine Sporenbildung induzieren, andere jedoch nicht. Ca-Ionen scheinen einen stimulierenden Effekt zu haben, wenn man sie den Ammonium- und Phosphat-Ionen zufügt. Ansteigende Konzentrationen von Sauerstoff hemmen die Sporogenese, ehe sie das vegetative Wachstum hemmen.

BETHGE (3) untersuchte 1947 in einer umfangreichen Arbeit die Bedingungen, die zur Versporung des FRAENKELschen Gasbacillus (Bac. welchii Typ A) führen. Er führte seine Untersuchungen mit Stämmen durch, die aus dem Gewebe von an Gasbrand erkrankten Soldaten des Rußlandfeldzuges des 2. Weltkrieges isoliert worden waren. Auch BETHGE schrieb der Reaktion des Nährmediums eine besondere Bedeutung für die Sporogenese zu. Er fand einen pH von 7,2 als optimal. Wurden zerlegbare Kohlehydrate zugesetzt, mußte mit einer Alkalizugabe von 1 - 1,25 % kristallinischer Soda ausgeglichen werden, um die alkalische Reaktion des Nährbodens beim Wachstum von Cl. perfringens zu gewährleisten. Ein Gehalt des Nährbodens von 0,5 % Traubenzucker war durch einen Alkaligehalt von insgesamt 1,5 % kristallinischer Soda zu kompensieren. Die Zugabe von 9 - 12 % Pepton sah er als optimal an. Mit eiweißreichen Nährböden erzielte BETHGE die besten Ergebnisse der Sporenbildung. Er verwendete Eiweiß in Form von Rindfleischbouillon, Hirnbouillon und Aszites (mit 5 % Chloroform versetzt), Organstückchen (Meerschweinchenleber, -herz und -niere), Alkali-Eiweiß und Hirnbrei. Mit diesen Nährsubstraten wurden hohe Sporenzahlen erzielt, wobei eine Brutschranktemperatur von 37° C am günstigsten war.

Bei der Untersuchung der Hitzeresistenz der Sporen, die BETHGE dem strömenden Dampf im Kochschen Dampftopf aussetzte, erhielt der Autor in Abhängigkeit von der Nährbodenzusammensetzung differierende Werte, die von 10 Min. bis zu 2 Std.

bei 100° C reichten. Er stellte fest, daß die Quantität der in einem Nährboden gebildeten Sporen des Cl. welchii nicht immer der Qualität der Sporen hinsichtlich ihrer Thermoresistenz entspricht.

Den Sporennachweis führte BETHGE mikroskopisch mit nach GRAM gefärbten Ausstrichen und mit der Erhitzungsmethode durch. Die Lage der Sporen beschrieb er als mittel- bis endständig unter Auftreibung des Bazillenleibes.

SHULL, THOMA u. PETERSEN (39) studierten die Sporulation von Cl. perfringens in ihrem Medium unter Zusatz von Aminosäuren, wie Arginin, Phenylalanin, Tyrosin, Valin und Isoleucin und beobachteten eine wesentliche Erhöhung der Sporenraten.

FOSTER, HARDWICK u. GUIRARD (11) bemerkten, daß in gewöhnlichen komplexen organischen Medien sog. Antisporulationsfaktoren (ASF) vorhanden sind oder beim Wachstum der vegetativen Formen der Bakterien frei werden, und daß diese Medien weit mehr "sporogen" sein können, wenn man Adsorbentien zuführt wie Stärke oder aktivierte Kohle. Diese Antisporulationsfaktoren sind z.B. gesättigte Fettsäuren wie Stearin- und Palmitinsäure. Die ASF liegen meist in gebundener Form im Medium vor, z.B. an Peptone oder Lipoproteide, Phospholipide und Cerebroside und können schon beim Autoklavieren aus den oben genannten Substanzen freigesetzt werden.

HARDWICK, GUIRARD u. FOSTER (16) hatten einen großen Erfolg in der Aktivierung der Sporulation, indem sie die Antisporulationsfaktoren durch Zufuhr von Adsorbentien wie Stärke und aktivierte Kohle (Norit A) banden. Sie versuchten auch die Extraktion der Fettsäuren mit Äthylazetat und stellten fest, daß sowohl die flüchtigen als auch die nicht flüchtigen Fettsäuren die Sporulation, nicht aber das Wachstum der Bakterien hemmen.

SUGIYAMA (43) untersuchte die Faktoren, welche die Hitze-resistenz von Sporen beeinflussen, und kam zu dem Schluß, daß Ca^{++} - und F^+ -Ionen die Hitzeresistenz erhöhen, während Magnesium-Ionen sie erniedrigen.

Fettsäuren wirken sich ebenfalls auf die Hitzetoleranz aus. Je länger die Fettsäurekette ist, desto stärker ist das Anwachsen der Hitzetoleranz. Es gibt auch eine Relation zwischen dem Grad des Ungesättigtseins der C_{18} -Fettsäuren und der Hitzestabilität der Sporen. Führt man eine Chloroform-Extraktion der Fettsäuren im Sporulationsmedium durch, so resultiert aus dieser Behandlung eine verminderte Hitze-resistenz der Sporen. In Zuckerlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen suspendierte Sporen zeigen einen Anstieg der Thermostabilität mit dem Anwachsen der Zuckerkonzentration.

MAGER, KINDLER u. GROSSOWICZ (27) bestätigen die Forschungen von SHULL, THOMA u. PETERSEN (39), die den Zusatz von Aminosäuren zum Sporulationsmedium und deren Wirkungsweise auf die Induktion einer Sporulation geprüft haben.

Von CAMPBELL u. HILMER (4) werden die Studien von CURRAN und EVANS (1937) bestätigt, welche die besonderen Nährsubstratforderungen von Sporen erforschten, die einer hohen Hitzebehandlung unterworfen worden waren. Sie berichten, daß die Sporen einiger Bazillen nach Behandlung mit hoher Hitze besonders anspruchsvoll hinsichtlich der Nährsubstrate sind, wenn sie auskeimen sollen. Diese Erkenntnis hat zum Gebrauch von Substanzen in den Suspensionsmedien geführt, die für den Nachweis hoch erhitzter Sporen benötigt werden.

ELLNER (9) gelang erstmalig die Zusammenstellung von Substanzen zu einem komplexen synthetischen Medium, mit dem er regelmäßig hohe Sporulationszahlen beim Cl. perfringens Typ A erzielte. Das Medium bestand aus Polypepton (BBL), Hefeextrakt, Stärke, MgSO_4 , KH_2PO_4 und $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und war eingestellt auf den optimalen pH 7,8. Setzte ELLNER statt der Stärke Mannitol oder Raffinose ein, so sah das

Sporulationsergebnis ähnlich aus, während jedoch der Zusatz von Glukose oder Laktose zu sehr viel niedrigeren Sporenzahlen führte. Obwohl Polypeptone laufend verwendet wurden, gaben andere Peptone äquivalente Resultate. Bei Verwendung des Magnesiums als $MgSO_4$ ergab sich eine beinahe verdoppelte Sporulationsrate bei einem *Cl. perfringens*-Stamm, während die Sporenerträge bei einigen anderen geprüften Stämmen nur geringgradig erhöht waren. Das Wachstum von *Cl. perfringens* im Sporulationsmedium war relativ gering und schien auf einige wenige Zellgenerationen begrenzt zu sein, ehe sich die Sporulation ereignete. Die sporulationsfördernde Eigenschaft wurde an 138 *Cl. perfringens*-Stämmen studiert. Eine über 90 %ige Sporulation wurde nicht selten gesehen. Bei Beimpfung des Sporulationsmediums mit anderen Clostridien, wie *Cl. sporogenes*, *Cl. tetani*, *Cl. tetanomorphum*, *Cl. botulinum* u.a. zeigte sich keine erhöhte Sporulation dieser Spezies. Diese Eigenschaft schien auf *Cl. perfringens* Typ A beschränkt zu sein.

Von HITZMAN, HALVORSON u. UKITA (21) wurde auf die bedeutende Rolle der Aminosäuren bei der Sporengermination hingewiesen. Es waren vor allen Dingen die 3 Aminosäuren L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Arginin, mit denen eine komplette Auskeimung der Sporen erreicht wurde. Auf die Bedeutung des L-Alanins für die Germination aerober Sporen wurde schon von anderen Autoren aufmerksam gemacht (STEWART u. HALVORSON (42), POWELL u. STRANGE (34)). Aus einer Veränderung der Konzentration oder einer Substitution der 3 Aminosäuren resultierte eine herabgesetzte oder gar ausbleibende Sporengermination. Der biochemische Funktionsmechanismus der 3 Aminosäuren ist noch unbekannt, doch scheint das Alanin hier die bedeutendste Rolle zu spielen.

LUND, JANSSEN u. ANDERSON (26) erforschten die Faktoren, welche die Sporogenese des klassischen Clostridium-Stammes PA 3679 beeinflussen. Sie bemerkten, daß der Sporulationsgrad des Teststammes in einem normalen Kulturzyklus gering war. Wenn aber die wachsende Population durch eine neue

kleine Population ersetzt wurde, bevor das Medium erschöpft war, sporulierte der Stamm gut. Diese sporulationsfördernde Eigenschaft, die während des Wachstums im Medium entsteht, ist entweder das Resultat der Entfernung von Komponenten aus dem Medium oder aber der Zugabe von Substanzen zum Medium. Um welche sporenfördernden, während der vegetativen Phase gebildeten Faktoren es sich hier handelt, konnte nicht eruiert werden.

In einem Medium, welches hohe Peptonkonzentrationen enthielt, konnte die Sporulation durch Zufuhr von Thiamin erhöht werden.

ZEISSLER, KRAUSPE u. RASSFELD-STERNBERG (49) stellten fest, daß *Cl. perfringens* in lebenden Tierkörpern selten Sporen bildet, dagegen aber auf Agar mit 2 - 3 % Na_2CO_3 , der kein von ihm angreifbares Kohlehydrat enthält, und in eiweißreichen Nährsubstanzen, die frei von fermentierbaren Kohlehydraten sind, oft gut sporuliert. Nach SHOETENSACK ist *Cl. perfringens* befähigt, Sporen zu bilden in Symbiosezüchtung mit *Bact. faecalis alkaligenes* auf Blutagar unter anaeroben Verhältnissen. Die Dampfresistenz der Sporen liegt zwischen 8 und 90 Minuten.

Nach STABLEFORTH u. GALLOWAY (41) sporuliert *Cl. perfringens* Typ A selten in saurem Milieu, jedoch häufiger in speziellen alkalischen Medien. Die Sporen sind groß, oval und subterminal gelegen und werden in weniger als 5 Minuten bei 100°C zerstört.

PREVOT (35) empfiehlt den Zusatz von Kalium-Phenylpropionat und Kalium-Phenylbutyrat in der Dosis von einigen hundertstel Gramm auf 100 ccm Bouillon.

Nach HALLMANN (15) kommt es zur Sporenbildung nur in einem nichtsauren, zuckerfreien Milieu, z.B. in einige Tage alten Leberbouillonkulturen mit Kreidezusatz oder besser noch in alkalischem Hirnbrei oder auf Agar mit 2 - 3 %igem Sodazusatz.

Die mehr end- als mittelständigen Sporen sollen keine Auftreibung der Stäbchen bewirken.

ZOHA u. SADOFF (50) beobachteten, daß die Zugabe von Pepton zum Medium die Sporogenese stimulierte, während Hefeextrakt diesen stimulierenden Effekt nicht hatte. Die Autoren bemerkten, daß in mit Magneten bewegten Kulturen mehr Sporen gebildet wurden als in nicht bewegten. Sie führten diesen Effekt darauf zurück, daß die Zellen bald nach vollendeter Gasbildung (nach 4 - 6 Std.) sedimentieren und die nutritiven Partikel des Mediums die vegetativen Zellen nicht mehr erreichen.

Durch Einleitung von Sauerstoff in das Medium wurden die Sporen aus den Stäbchen freigesetzt. Die Art der Wirkung des Sauerstoffs ist nicht bekannt, aber die Lysis der Zellen beruht vielleicht auf der Akkumulation und der Reaktion des Peroxydes mit dem Zell-Flavoproteinsystem.

Von COLLEE, KNOWLDEN u. HOBBS (5) wurde behauptet, daß die Thermoresistenz der Sporen genetisch determiniert ist.

PARISH (32) isolierte aus 58 sechs bis sieben Wochen alten Hähnchen, die, kurze Zeit nachdem sie gekauft worden waren, verendeten, *Cl. perfringens* Typ F, dessen Sporen 2 Std. lang einer Erhitzung von 100° C widerstanden.

PERKINS u. TSUJI (33) erkannten die sporulationsfördernde Eigenschaft des Arginins. Es wird von *Cl. perfringens* abgebaut.

Von ANGELOTTI und Mitarbeitern (1) wurden 1962 die *Cl. perfringens*-Stämme A - F, HOBBS Stamm Nr. 1 und mehrere aus vergifteten Lebensmitteln isolierte Stämme auf ihre sporogenen Eigenschaften in 4 verschiedenen Medien (ELLNER 1956, ZOHA-SADOFF 1958, SAMES 1961 und LUND 1955/56) untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Sporulationsrate im LUND-Medium am größten war. Die Sporen wurden in gefärbten Ausstrichen oder durch bakterielle Prüfung des 10 Min. lang auf 80° C erhitzten Nährmediums nachgewiesen.

HALL und Mitarbeiter (14) untersuchten 1963 83 Stämme des Cl. welchii Typ A. Die Stämme wurden aus Nahrungsmitteln, die Lebensmittelvergiftungen hervorgerufen hatten, aus tierischem Untersuchungsmaterial oder aus natürlichen Stoffen (Erde, Faeces) isoliert und typisiert sowie auf ihre Sporulationsfähigkeit in 5 verschiedenen Medien geprüft. Es handelte sich dabei um das ELLNER-Medium, das Medium von ZOHA und SADOFF (50), SAMES' Modifikation des ELLNER-Mediums (er setzte für MgSO_4 MnSO_4 ein), das SAMES-Medium (bestehend aus Hefeextrakt, Aminokaseinsäuren, Stärke, NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$) und das Medium von ANGELOTTI et al. (1). Die in verschiedenen Medien geprüften Stämme produzierten verschieden hohe Sporenzahlen mit differenten Hitzeresistenzwerten.

Die Autoren glaubten eine Korrelation zwischen niedrigen Sporenzahlen und hohen Thermoresistenzwerten, hohen Sporenzahlen und geringen Hitzeresistenzwerten annehmen zu können.

DESPAUL (6) meinte, daß die Hitzeresistenz-Charakteristika der Sporen, die im ELLNER-Medium produziert wurden, nicht mit den im Intestinaltrakt und in rohem Fleisch produzierten identisch sind. Beispielsweise beobachtete er eine größere Sporulation in ROBERTSONs Kochfleischbrühe als im ELLNER-Medium.

BARNES, DESPAUL u. INGRAM (2) studierten das Verhalten eines Lebensmittelvergifters vom Typ F 2988/50 im Rindfleisch. Ein Inokulum von 10^5 Sporen dieses Stammes überlebte die Dampferhitzung im Fleisch bei 100°C 5 Std. lang. Dabei wurde die Sporenzahl um das Siebenfache pro Stunde reduziert. Die Sporen überlebten schließlich 6 Monate in gefrorenem Fleisch, das bei -5°C und -20°C aufbewahrt worden war, während die vegetativen Zellen schneller bei -5°C als bei -20°C zugrunde gingen. In Rindfleisch, das bei 1° , 5° , 10° und 15°C 13 Tage lang aufbewahrt wurde, trat keine Vermehrung der Keime ein, sondern eine langsame Zerstörung der vegetativen Zellen, während in der Sporenzahl kaum ein Absinken

zu verzeichnen war. Eine langsame Vermehrung der vegetativen Formen war bei 20° C evident, bei 25° C und 37° C jedoch war das Wachstum rapide. Nur 3 % der Sporen keimten ohne vorherigen Hitzeschock aus. Die Sporengermination erfolgte jedoch im rohen Fleisch sehr schnell, wenn das Fleisch erhitzt worden war.

SCHNEIDER, GRECZ u. ANELLIS (38) benutzten zum Studium der Sporulation von *Cl. perfringens* einen besonderen Apparat. Dieser bestand aus einem ineinandergefalteten Zellulosebeutel, der in ein großes Pyrex-Röhrchen - ein Sporulationsmedium enthaltend - eingetaucht wurde. Eine große Zahl vegetativer Zellen, in physiologischer NaCl suspendiert, wurde in den Dialyse-Beutel gegeben. Nach 10 - 12tägiger Inkubationszeit kam es zu einer maximalen Sporenpopulation von 10^{10} bis 10^{11} Sporen pro Liter Sporulationsmedium. Mit dieser Dialyse-Beutel-Methode konnte auch bei *Cl. botulinum* und bei dem "putrefactive anaerobe" 3679, die sonst nur geringe Sporenzahlen produzierten, eine sehr gute Sporulation erzielt werden. Das Sporulationsmedium bestand aus trypsiniertem Kasein, Pepton, NaCl, K_2HPO_4 , Methionin und Thiamin und hatte einen pH-Wert von 8,0.

YAMAGISHI, ISHIDA u. NISHIDA (47) isolierten aus der Erde *Cl. welchii*-Stämme, deren Sporen sehr hitzelabil und nach 10 minütiger Erhitzung bei 80° C abgetötet waren.

HOBBS (22) meint, daß *Cl. welchii* schneller im Intestinaltrakt versport als in den Versuchsmedien.

Von MIDURA und Mitarbeitern (29) wurde die Strahlenresistenz eines klassischen und eines atypischen hitzeresistenten Stammes von *Cl. perfringens* Typ A geprüft. Die Sporulation erfolgte im ELLNER-Medium und in einem trypsinierten Kasein-Medium. Annähernd 106 lebensfähige Sporen pro ml wurden in 0,06 m Phosphatpuffer suspendiert und mit γ -Strahlen von Kobalt 60 beschickt. Obwohl die Sporen des klassischen und des atypischen *Cl. perfringens*-Stammes Typ A durch Unter-

schiede in der Hitzeresistenz charakterisiert waren, zeigten beide Stämme eine ähnliche Strahlenresistenz, wobei allerdings eine höhere Strahlenresistenz bei den in Kochfleischbrühe gebildeten als bei den in Phosphatpuffer suspendierten Sporen vorhanden war.

HAYNES u. RHODES (18) beobachteten, daß *Bac. popilliae* nur dann in flüssigen Kulturen versporste, wenn dem Medium aktivierte Kohle (Norit A) zugeführt wurde. Die erhaltenen Sporen waren sehr resistent und überlebten lange an der Luft, im Sand und in der Erde.

GROOM u. STRONG (13) prüften die Sporulation von 7 Stämmen des Cl. welchii in 4 Versuchsmedien (ELLNER-Medium, ROBERTSONs Kochfleisch-Medium, SEC-Medium und das selbst entwickelte Medium). Im ELLNER-Medium wurde die größte Sporenzahl erzielt, doch war die Hitzeresistenz nicht sehr ausgeprägt. Die Morphologie der Sporen differierte im ELLNER-Medium von der Morphologie der in den 3 anderen Medien gebildeten Sporen. Es wurde beobachtet, daß die Thermoresistenz der Sporen proportional zu der Verlängerung der Inkubationszeit anstieg. Nach 15tägiger Bebrütungszeit war die Hitzeresistenz der im SEC-Medium erzeugten Sporen geringfügig höher als die Hitzeresistenz der in den 3 anderen Medien produzierten Sporen. In keinem Fall kam es zu einer totalen Zerstörung aller Sporen bei 100° C.

Von KIM, CHENEY u. WOODBURN (23) wurde 1967 ein modifiziertes Medium entwickelt, welches sich aus Komponenten des SEC-Mediums und des ELLNER-Mediums zusammensetzte. Es bestand aus Pepton, trypsiniertem Kasein, Stärke, NaCl und MgSO₄ sowie Natrium-Thioglykolat und geringen Mengen Thiaminhydrochlorid. Die Bebrütungstemperatur war optimal bei 37° C im Vergleich zu 5°, 22° und 46° C. Die im modifizierten Medium erzielten Sporenmengen waren größer als die im SEC-Medium produzierten, und die Thermoresistenz der Sporen war höher als im ELLNER-Medium, wenn sie im neuen Medium suspendiert wurden.

Die Sporulation begann nach 6 Std. und war nach 20stdg. Inkubation bei 37° C abgeschlossen.

Durch den Zusatz von Pepton, trypsiniertem Kasein und Aminokaseinsäure zum SEC-Medium wurden Sporenzahlen und Hitzeresistenzwerte der Sporen erhöht. Der Einsatz von Proteose-Pepton (No. 3 Difco) an Stelle von Pepton brachte keine Verbesserungen, während der Zusatz der Kombination von trypsiniertem Kasein und Pepton bessere Resultate zeitigte als der Einsatz von Proteose-Pepton allein.

Wie DUNCAN u. STRONG (7) in einer kürzlich erschienen Arbeit bemerkten, ist es sehr schwierig, einen "befriedigenden Grad der Sporulation bei einigen Stämmen des Cl. perfringens zu erzielen".

Sie entwickelten ein Medium, das sich zusammensetzte aus 0,4 % Hefeextrakt, 1,5 % Proteose-Pepton, 0,4 % löslicher Stärke, 0,1 % Natrium-Thioglykolat und 1,0 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und das bei allen 5 getesteten Stämmen des Cl. welchii das 100- bis 10 000-fache der im SEC-Medium (von ANGELOTTI et al. (1))erzielten Sporenzahlen produzierte. 3 von 5 Stämmen erzielten das 100- bis 1 000-fache an Sporen im Vergleich zum ELLNER-Medium, das bisher als das erfolgreichste Medium für eine Induktion der Sporogenese von allen Autoren beschrieben worden war. 18 von 27 Stämmen produzierten das 10- bis 100-fache der im KIM-Medium erhaltenen Sporenerträge.

In einigen Fällen konnte durch die Zugabe von Aktivkohle (Norit A) zum neuen Medium der Sporenertrag vergrößert werden. Der Einschluß von Aktivkohle verlieh den Sporen nur eine unbedeutend größere Hitzeresistenz.

DUNCAN u. STRONG (7) sind der Ansicht, daß die größeren Unterschiede in der Hitzeresistenz verschiedener Stämme eher genetisch determiniert, als durch ein besonderes Medium bedingt zu sein scheinen. Sie stellten fest, daß die in den 4 verschiedenen Medien (ELLNER-Medium (9), Medium von KIM et al. (23), SEC-Medium von ANGELOTTI et al. (1), neues

Medium von DUNCAN u. STRONG) produzierten Sporen der 5 Teststämme sich unterschiedlich in ihrer Thermoresistenz verhielten. Hitzeresistenzversuche und Hitzeschocks wurden in 0,067 Phosphatpuffer mit pH 7,0 durchgeführt. Anschließend wurden die Sporen durch Kultivierung auf SPS-Agar (Sulfit-Polymyxin-Sulfadiazin) auf ihre Zahl und Lebensfähigkeit geprüft.

Wie andere Autoren vorher, so postulierten auch DUNCAN u. STRONG die Anwendung des Hitzeschocks als eine *conditio sine qua non* für die Sporengermination. Der Hitzeschock wurde individuell für die hitzesensitiven Stämme bei 70° - 75° C und für die hitzeresistenten Stämme bei 80° C für 20 Min. als optimal befunden.

Das Abtöten aller vegetativen Formen erreichten die Autoren, indem sie die Thioglykolat-Kulturen 20 Min. lang auf 75° C erhitzten.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

A. Material

Stämme und Kultivierung

Zur Verwendung kamen für die Untersuchungen 16 typisierte Stämme des *Clostridium perfringens*, von denen die Stämme Typ A CN 3920, Typ B CN 684, Typ C CN 3690, Typ D CN 3683 und Typ F CN 3754 im September 1967 und der Stamm Typ E CN 5063 im Mai 1964 als lyophilisierte Kulturen in Vakuumampullen von Burroughs Wellcome & Co. aus London bezogen wurden. Die Stämme Typ A 3624 und Typ B 3626 befanden sich seit September 1967 im Institut und waren in lyophilisierter Form von der amerikanischen Typkultursammlung aus Rockville (Maryland) bezogen worden, während der Stamm D 175 dem Institut als Lyophilisat im März 1962 von Prof. Dr. Mitscherlich, Göttingen, zur Verfügung gestellt worden war.

Die Tierstämme Typ A 1048 (von einer weiblichen Giraffengazelle: *Litocranius walleri*), Typ A 817 (von einem Rentier: *Rangifer tarandus*), Typ A 172 (von einer Kuduantilope: *Tragelathus strepsiceros*), Typ A 158 (von einem Säbelantilopenbock: *Oryx tao*) und Typ A 342 (von einem Giraffengazellenbock: *Litocranius walleri*) waren 1966 und 1967 aus Tieren des Berliner Zoos, die an perakut verlaufenden *Cl. perfringens*-Infektionen verendeten, isoliert und im Institut typisiert worden. Die Stämme Typ A Weizen III (von Futterweizen isoliert) und der Erdstamm Typ A P 55 (aus der Erdprobe eines öffentlichen Berliner Parks isoliert) wurden im Jahre 1966 typisiert.

Alle 16 Stämme wurden in Reagenzröhrchen mit Leb.-Leb.-Bouillon (LLB) bei Kühlschranktemperaturen unter Paraffinverschluß aufbewahrt, nachdem sie zur Prüfung auf Reinheit und Wachstumsintensität auf Traubenzucker-Blutagar-Platten (Pyrogallol-K₂CO₃-Pottasche-Verfahren mit Bierfilz) subkultiviert worden waren.

B. Technik

1. Nährmedien

a) Leber-Leber-Bouillon (LLB)

Vorversuche mit alkalisierter LLB (pH 8,0) unter Pufferzusatz von 5 % Na_2HPO_4 x 12 H_2O ergaben hinsichtlich der Induktion der Sporulation bei den oben beschriebenen Perfringens-Stämmen keine positiven Resultate. LLB diente, abgesehen von den später beschriebenen Thermoresistenzversuchen, der Aufbewahrung und Aktivierung der Kulturen. Cl. perfringens vermehrte sich sehr schnell in der Bouillon unter starker Trübung und Gasentwicklung. Der pH-Wert fiel nach 20 - 24-stdg. Inkubation von pH 8,0 auf pH 4,8.

b) Thioglykolat-Medium

Verwendung fand ein Fertigpräparat, Bacto-Thioglycollate-Medium (w/o Dextrose or Indicator, pH 7,2) von Difco. Jeweils 8 ml des Nährbodens wurden in Reagenzröhrchen abgefüllt und mit einem Vaselinering versehen. Aus frischen, 6 Std. lang bei 37° C inkubierten LLB-Kulturen wurden jeweils 0,1 ml der Flüssigkeit auf Thioglykolat-Medium überimpft, das vorher 10 Min. lang bei 99,5° C erhitzt und in Schräglage abgekühlt worden war, wobei sich der Vaselinering an der Röhrchenwand verfestigte. Nach der Inokulation wurde die Vaseline zwecks Erreichung eines luftdichten Abschlusses wieder verflüssigt. Es schloß sich eine 16-stündige Bebrütung bei 37° C an. Nach dieser Zeit konnte neben einer Trübung des Mediums eine mehr oder weniger starke Gasentwicklung beobachtet werden. Der pH fiel nach 16-stündiger Inkubation von 7,2 auf 6,8.

c) Herstellung des Sporulationsmediums nach ELLNER

Für die Induktion der Sporulation wurde das synthetische ELLNER-Medium (1956) verwendet, weil frühere Versuche mit anderen Nährmedien keine oder nur wenig befriedigende

Resultate erbracht hatten.

Das Sporulationsmedium bestand aus 1 % Bacto-Peptide (Difco) - ELLNER verwendete Polypepton (BBL) - 0,3 % Hefeextrakt, 0,3 % löslicher Stärke, 0,01 % MgSO_4 , 0,15 % KH_2PO_4 und 5 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$. Diese Komponenten wurden in destilliertem Wasser gelöst und eingestellt auf pH 7,8, in späteren Studien auf pH 8,5, mit 10 % NaOH. Die Lösung wurde mit einer Mutospritze in Reagenzröhrchen zu 8 ml abgefüllt und mit Vaseline luftdicht verschlossen. Es folgte die Sterilisation im Autoklaven bei 1 atü und 121°C 15 Min. lang.

Anaerobiose wurde erzielt, indem man das Medium vor der Beimpfung 10 Min. lang in kochendem Wasser erhitzte und dann unter fließendem kalten Wasser frappte. Beimpfungen wurden mit 1 ml-Pipetten durchgeführt. Die Induktion einer Sporulation gelang durch Entnahme von 0,5 ml einer 8 - 12 Std. alten Thioglykolat-Kultur, die man mit der Pipette auf den Boden der Röhrchen mit dem Medium verbrachte.

Die Kulturen wurden 7 Tage lang bei 37°C bebrütet und alle 24 Std. durch mikroskopische Untersuchungen und Thermoresistenzteste auf Sporenquantität und -qualität geprüft. Der pH des ELLNER-Mediums veränderte sich lediglich in den ersten 24 Std. der Inkubation von pH 8,5 auf pH 8,3, blieb während der übrigen Bebrütungszeit aber dann konstant. Das mit pH 7,8 angesetzte Medium blieb in seiner Reaktion unverändert.

Versuche, aktive Leb.-Leb.-Bouillon-Kulturen direkt in das Sporulationsmedium zu verbringen, zeitigten keinen Erfolg in der Sporulationsinduktion.

2. Sporennachweis und Sporenzählung

a) Färbung nach RAKETTE

Da sich andere Färbemethoden, z.B. die GRAM-Färbung, als wenig geeignet für den mikroskopischen Sporennachweis erwiesen, wurde die RAKETTE-Färbung als sichere Methode benutzt, um Sporen nachzuweisen.

Die etwa zur Hälfte mit dem zu untersuchenden ELLNER-Medium gefüllten Reagenzröhrchen wurden 5 Min. lang geschüttelt, um eine gleichmäßige Dichte der Sporen und vegetativen Formen zu gewährleisten. Auf gefelderte Objektträger (2,5 x 3,5 cm) wurden 0,2 ml der geschüttelten Kultur pipettiert und ausgestrichen. Die Flüssigkeit wurde durch Schwenken des Objektträgers ca. 50 cm über kleiner Bunsenbrennerflamme verdunstet. Es schloß sich die Sporenfärbung nach RAKETTE an. Die Sporen waren als grüne kugelige bis ovoide Gebilde von den rot gefärbten vegetativen Formen gut differenzierbar.

b) Zählung der vegetativen Formen und Sporen

Es wurde im Hellfeld bei einer Vergrößerung von 8 x 100 (Objektiv: Planapo, 100/1,3 Öl) mikroskopiert. Alle 24 Std. wurde für die Dauer von 7 Tagen von jedem zu untersuchenden Stamm ein nach RAKETTE gefärbter Ausstrich angelegt. Von jedem Ausstrich wurden 10 Gesichtsfelder ausgezählt und die Sporen und vegetativen Formen in ein prozentuales Verhältnis gebracht. Zur Sicherung des Ergebnisses wurde jeder Versuch zweimal unter denselben Bedingungen durchgeführt. Es wurde evident, daß diese direkte Methode der Sporen- und Keimzählung zu fast gleichen Resultaten führte.

3. Hitzeresistenzprüfungen

Die Prüfung der Hitzeresistenz der Sporen wurde nach der von ZEISSLER (48) im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen angegebenen Methode durchgeführt. Die im ELLNER-Medium gut versporteten Kulturen der A-Stämme und die Typstämme (A - F) wurden unterschiedlich lange (zwischen 2 und 12 Min.) im Kochschen Dampftopf strömendem Dampf ausgesetzt und nach Ablauf der Erhitzungszeit sofort unter fließendem Leitungswasser abgekühlt und dann 24 Std. lang bei 37° C inkubiert. Danach wurde aus der Tiefe der Reagenzröhrchen mittels einer 1 ml-Pipette etwa 0,5 ml Material entnommen, damit ein frisch hergestelltes bzw. frisch ausgekochtes LUB-Röhrchen beimpft und dieses wenigstens 10 Tage lang bei 37° C bebrütet. Gleichzeitig wurde zur Prüfung der Kultur auf Reinheit 1 ml des Materials auf eine 16 Std. bei 37° C vorgetrocknete Glukose-Blutagar-Platte (nach ZEISSLER) pipettiert. Durch Schwenken erfolgte ein gleichmäßiges Verteilen des Inokulums auf dem Nährboden. Weil dieser vorgetrocknet war, wurde die Flüssigkeit innerhalb weniger Minuten aufgesogen. Die Bebrütung der Nährböden erfolgte 24 Std. bei 37° C nach dem Pyrogallol-Pottasche-Bierfilzverfahren (nach HARTWIGK u. TZIMAS (17)). Nach Überstehen der Erhitzungszeit wurde die Reinheit der Kultur im GRAM-Präparat mikroskopisch überprüft.

Nach demselben Verfahren wurden auch die auf LUB-Bouillon und Thioglykolat-Medium subkultivierten, 24 Std. lang bebrüteten, vegetativen Cl. perfringens-Kulturen Thermoresistenzprüfungen unterworfen.

C. Ergebnisse

Cl. perfringens (welchii) ist durch seine runden, an den Rändern scharf abgesetzten oder auch gezackten, resedagrünen Kolonien und die meist doppelzonigen, an der Luft schmutziggrün werdenden Haemolysehöfe auf Traubenzucker-Blutagar-Platten sowie durch seine Unbeweglichkeit gekennzeichnet. Die Stäbchen sind ziemlich plump, zuweilen allerdings auch fadenförmig und an den Enden abgerundet (REPLOH und OTTE (36)).

Cl. welchii nimmt unter den anaeroben Bazillen, ähnlich dem Cl. botulinum, eine Sonderstellung ein, da er bei Vermehrung in den üblichen Nährböden nicht versport. Doch ist es auch in Nährmedien mit bestimmten sporulationsfördernden Zusätzen, wie L-Alanin, Valin, Isoleucin, Arginin und anderen Substanzen schwierig, einen befriedigenden Sporenertrag bei einigen Stämmen des Cl. perfringens zu erzielen (DUNCAN und STRONG (7)).

Eigene Versuche, mit alkalisierter Leb.-Leb.-Bouillon (pH 8,0) unter Pufferzusatz von 5 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ eine Sporenbildung zu induzieren, blieben ohne Erfolg.

Das ELLNER-Medium schien aber geeignet, bei Stämmen des Cl. perfringens Typ A eine hohe Sporulationsrate zu erzielen. Denn ELLNER (9) fand bei 138 Cl. perfringens-Stämmen vom Typ A in einem neuen synthetischen Medium von pH 7,8 ausnahmslos Sporulationsraten von 70 - 90 % und darüber.

1. Sporulationsaktivität von Cl. perfringens-Stämmen Typ A - F im ELLNER-Medium

Eigene Studien hatten das Ziel, an 16 typisierten Cl. perfringens-Stämmen A - F, die verschiedener Herkunft waren, die Sporulationsrate mit Hilfe des ELLNER-Mediums zu prüfen.

a) Versporung von 9 Stämmen des Cl. perfringens Typ A
bei unterschiedlichem pH (7,8 und 8,5)

In den Tabellen 1 und 2 sind die Sporulationswerte von 9 A-Stämmen verschiedener Herkunft in Prozent (Verhältnis der Sporen zu den vegetativen Formen) während einer Zeit von 7 Tagen eingezeichnet. Die in jedem Tagesabschnitt der Tabelle erscheinenden zwei Werte sind die Sporenzahlen, die bei Einstellung des ELLNER-Mediums auf pH 7,8 und 8,5 je zweimal in getrennten Untersuchungen in einem Abstand von 14 Tagen ermittelt wurden.

Tabelle 1: Ergebnisse der Sporulation der A-Stämme im ELLNER-Medium bei pH 7,8

Bezeichnung der Stämme	Inkubationszeit in Tagen und Sporulation in %						
	1	2	3	4	5	6	7
A CN 3920	93,4 - 97,2	58 - 61,5	67 - 69,2	86,3 - 89,7	91 - 93,7	94,6 - 98,1	99,5 - 100
A 3624	1 - 3,5	6,4 - 8,3	28 - 30,1	6,5 - 7,6	0,4 - 1,5	10 - 10,6	6,8 - 7,4
A 1048	47,4 - 52	39,6 - 43,2	20,9 - 22,2	2,9 - 3,5	62,3 - 70	85,7 - 87,4	96,6 - 100
A 817	2,9 - 5	4 - 8,6	9,2 - 10	12,4 - 15,7	8,9 - 9,1	0 - 0,5	0 - 1,2
A 172	28 - 29,1	34,2 - 82,4	78,6 - 88	82,4 - 85	87,6 - 93,2	88,2 - 93,6	99,8 - 100
A 158	82,1 - 86,6	77,7 - 84	89,1 - 89,9	63 - 69,7	64,2 - 72	79,6 - 83,4	94,5 - 95,4
A 342	0,62 - 0,96	1,6 - 2,5	3,2 - 3,6	0	53,4 - 62,1	0	0
A Weizen III	0	0 - 0,1	0	0	0	0	0
A P 55	65,9 - 85	89 - 96,9	95,4 - 98,2	86,6 - 89,7	86,7 - 97,3	86,2 - 92	94,1 - 96,2

Die Sporenerträge variieren an den einzelnen Tagen von Stamm zu Stamm beträchtlich. Relativ hohe Sporulationsraten zeigen die Stämme Typ A CN 3920, A 1048, A 172, A 158 und A P 55, während die Stämme Typ A 3624, A 817, A 342 und A Weizen III nur gering und zeitweise überhaupt nicht (Stamm A Weizen III) sporulierten. Der pH-Wert von 7,8 veränderte sich während der 7-tägigen Inkubationsdauer nicht.

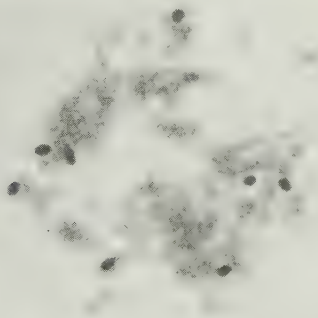
Ein ähnlicher Versuch wurde mit den gleichen Stämmen wie vorher bei Einstellung des ELLNER-Mediums auf einen pH-Wert von 8,5 durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Sporulation der A-Stämme im ELLNER-Medium bei pH 8,5

Bezeichnung der Stämme	Inkubationszeit in Tagen und Sporulation in %						
	1	2	3	4	5	6	7
A CN 3920	95,2 - 97,8	88,6 - 92,3	85 - 90,2	62,3 - 68,7	81,6 - 85,7	100	100
A 3624	5,1 - 5,9	36,7 - 39,3	25,8 - 27,3	44,8 - 45,2	92,6 - 98,4	98,6 - 100	99,4 - 100
A 1048	25,3 - 29,6	68 - 73,9	39,2 - 41,9	65,2 - 69,6	62,4 - 89,7	64 - 68,4	92,4 - 94,6
A 817	0	0 - 3,2	19,4 - 23,6	25,3 - 29,8	7,9 - 11,2	1,6 - 2,3	0
A 172	20,7 - 22,4	13,2 - 14,6	3,2 - 4,6	24,2 - 29,5	72,7 - 75,8	61,5 - 64	62,5 - 65,3
A 158	11,4 - 15,7	16,2 - 18	16,6 - 17,3	52,3 - 56,6	40,5 - 42,1	75,2 - 80	37,5 - 41,2
A 342	0	0,42 - 0,93	0 - 0,13	0 - 1,4	2,6 - 3,1	0 - 0,6	0
A Weizen III	0	0 - 0,72	0	0 - 0,34	1,4 - 1,6	0	0
A P 55	57,4 - 72,1	70 - 85,2	92,7 - 97,2	90,4 - 92,4	84,6 - 88,7	93,3 - 93,8	92,6 - 100

Im Vergleich zu dem ersten Versuch zeigt der Stamm Typ A 3624 bei einem pH-Wert von 8,5 erheblich bessere Sporenerträge. Ebenfalls günstiger gestaltet sich die Sporulationsrate bei den Stämmen Typ A 817 und A Weizen III, während bei den anderen A-Stämmen keine wesentlichen Unterschiede nachzuweisen waren. Der pH-Wert des ELLNER-Mediums sank in den ersten 24 Stunden der Inkubation von pH 8,5 auf 8,3, blieb dann aber in der weiteren Bebrütungszeit gleich. Das vegetative Wachstum im ELLNER-Medium war bei beiden pH-Werten optimal, wie aus der starken Gasbildung und Trübung des Mediums in den ersten 2 bis 3 Tagen zu erkennen war. Danach nahm das Wachstum kontinuierlich ab.

Nach 24-stdg. Inkubation bei 37° C lagen die Sporen zum großen Teil intrazellulär, später fast nur noch extrazellulär. Die Sporen lagen teils zentral, teils subterminal. Mitunter war der Bazillenleib durch die Sporen aufgetrieben. In Übereinstimmung mit ELLNER (9) ergaben sich bei eigenen Untersuchungen Unterschiede in der Morphologie der Sporen bei den einzelnen Stämmen. Einige Sporen waren sehr groß und blasenförmig (z.B. vom Stamm Typ A 1048), andere erschienen relativ klein und homogen (z.B. vom Stamm Typ A P 55).



Die Abbildung zeigt die Versporung des Stammes Typ A 1048 im ELLNER-Medium bei pH 7,8 nach 48-stdg. Inkubation.
Vergr. 200-fach

b) Vergleichende Prüfung der Sporenerträge der Stämme
B - F bei unterschiedlichem pH (7,8 und 8,5)

In der Tabelle 3 sind die Sporenerträge der beiden
B-Stämme CN 684 und 3626 im ELLNER-Medium mit den pH-
Werten 7,8 und 8,5 zusammengestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Sporulation der B-Stämme bei pH
7,8 und 8,5 in Beziehung zur Inkubationsdauer

Bezeich- nung der Stämme	pH	Inkubationszeit in Tagen und Sporulation in %						
		1	2	3	4	5	6	7
B CN 684	7,8	62,5 - 65,0	8,3 - 10,0	8,5 - 9,2	57,8 - 60,7	65,2 - 66,5	94,3 - 96,0	76,5 - 73,8
B CN 684	8,5	7,8 - 9,2	29,8 - 32,3	59,7 - 61,5	63,2 - 65,7	66,7 - 68,2	76,8 - 96,1	85,9 - 87,5
B 3626	7,8	0	0	0	0	0	0	0
B 3626	8,5	0	27,9 - 32,3	45,2 - 47,8	64,2 - 72,5	41,5 - 45,4	52,8 - 55,6	65,5 - 68,3

Der Stamm B CN 684 läßt bei den beiden pH-Werten etwa gleiche
Sporenerträge bis zu 96 % erkennen. Allerdings steigt die
Sporulationskurve bei pH 8,5 nur langsam an, während der Stamm
bei pH 7,8 nach 24-stdg. Inkubation schon Sporenraten bis zu
65 % zeigt. Einen deutlichen Sporulationsunterschied weist
aber der Stamm B 3626 bei differentem pH-Wert des Mediums auf.
Er sporuliert bei pH 7,8 nicht, bei einem pH von 8,5 kommt es
hingegen zu einer starken Sporulation, die nach 48-stdg.
Inkubation verzögert eintritt und ihr Maximum am 4. Tag
erreicht.

In der folgenden Tabelle 4 sind die Sporenerträge des Stammes
Typ C CN 3690 in Relation zur Inkubationsdauer bei unter-
schiedlichem pH (7,8 und 8,5) wiedergegeben.

Tabelle 4: Sporulationsergebnisse des C-Stammes bei pH 7,8 und 8,5 des ELLNER-Mediums in Beziehung zur Bebrütungszeit

Bezeichnung des pH Stammes		Inkubationszeit in Tagen und Sporulation in %						
		1	2	3	4	5	6	7
C CN 3690	7,8	6,2 - 7,4	2,3 - 3,6	5,0 - 6,5	2,9 - 4,2	18,0 - 29,2	8,7 - 9,4	10,0 - 11,4
C CN 3690	8,5	0 - 0,2	4,6 - 5,2	3,1 - 3,5	4,6 - 5,2	2,6 - 3,3	1,2 - 2,4	3,4 - 3,9

Die Sporenquantität des Typ C CN 3690 ist bei pH 7,8 deutlich größer als bei pH 8,5. Relativ zum vegetativen Wachstum jedoch, das bei beiden pH-Werten sehr stark war, blieben die Sporenerträge gering. Bei pH 8,5 trat am 1. Tag der Bebrütung verzögerte Sporogenese auf.

Die sporulationsfördernde Wirkung des ELLNER-Mediums wurde auch bei den Stämmen Typ D CN 3683 und D 175 bei unterschiedlich eingestellter Reaktion des Mediums geprüft. Die an 7 aufeinander folgenden Tagen erhaltenen Ergebnisse der Sporulationsaktivität dieser beiden Stämme zeigt die Tabelle 5.

Tabelle 5: Ergebnisse der Sporulation der D-Stämme im ELLNER-Medium bei pH 7,8 und 8,5

Bezeichnung der pH Stämme		Inkubationszeit in Tagen und Sporulation in %						
		1	2	3	4	5	6	7
D CN 3683	7,8	39,8 - 45,3	26,2 - 28,0	3,6 - 4,2	58,2 - 60,0	45,6 - 49,3	9,0 - 11,3	21,7 - 24,0
D CN 3683	8,5	28,4 - 32,8	41,9 - 45,3	73,4 - 75,5	43,7 - 46,2	69,6 - 72,3	89,2 - 94,2	97,8 - 100
D 175	7,8	0	0	0	0	0	0	0
D 175	8,5	0	2,1 - 3,2	0	11,3 - 15,4	0	0	0

Deutlich ist bei Stamm D CN 3683 der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die sporulierende Aktivität ausgeprägt. Bei pH 8,5 zeigt dieser Stamm am 7. Inkubationstag Sporen-raten von über 97 %, während bei pH 7,8 maximale Sporenerträge am 4. Bebrütungstag bis zu 60 % auftreten. Der Stamm D 175 sporulierte bei pH 7,8 nicht und zeigte bei pH 8,5 nur am 2. und 4. Bebrütungstag spärliche Sporenmengen bis zu 15,4 %.

Die sporulativen Eigenschaften des Stammes E CN 5063 im ELLNER-Medium bei unterschiedlichem pH wurden alle 24 Stunden eine Woche lang durch mikroskopische Untersuchung getestet. Die Ergebnisse dieser Prüfung sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Resultate der Sporulation des E-Stammes im ELLNER-Medium bei pH 7,8 und 8,5

Bezeichnung des Stammes	pH	Inkubationszeit in Tagen und Sporulation in %						
		1	2	3	4	5	6	7
E CN 5063	7,8	0,6	0	2,2	0,6	40,2	49,7	6,2
		- 1,3	- 0,9	- 2,5	- 1,2	- 53,9	- 55,6	- 8,0
E CN 5063	8,5	2,3	26,6	89,2	81,8	37,5	97,8	85,2
		- 3,6	- 27,2	- 92,4	- 85,3	- 47,6	- 100	- 92,4

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Stamm E CN 5063 bei pH 8,5 weitaus größere Sporenerträge produziert, als bei pH 7,8. Während nach 24-stdg. Inkubation die Sporulationsaktivität bei unterschiedlichem pH des Mediums noch ähnlich gering ist, steigt der Sporenertrag bei pH 8,5 sehr schnell mit fortschreitender Bebrütungszeit an und hat nach 3 Tagen sein erstes Maximum mit etwa 90 %. Bei pH 7,8 wird ein Maximum von nur etwa 53 % erst am 6. Inkubationstag erreicht.

Bei der Inkubation des *Cl. perfringens*-Stammes Typ F CN 3754 zeigte sich, daß er im ELLNER-Medium weder bei pH 7,8 noch bei pH 8,5 sporulative Aktivität aufweist.

Deutliche Unterschiede zeigten sich lediglich in der Intensität des Wachstums und der Morphologie der vegetativen Formen bei differentem pH-Wert des Mediums insofern, als das Wachstum bei pH 7,8 sehr schwach war und die Keime sich als sehr schmale Stäbchen zeigten. Bei pH 8,5 hingegen war das vegetative Wachstum schon nach 24-stdg. Inkubation stark ausgeprägt, wobei die Keime mikroskopisch in großer Anzahl als große, plumpe Stäbchen zu erkennen waren.

2. Hitzeresistenzprüfungen bei den Stämmen A - F

Die Prüfung der Hitzeresistenz der Sporen und der vegetativen Formen von *Cl. perfringens*-Stämmen wurde nach der von ZEISSLER angegebenen Methode (48) durchgeführt. 24 Stunden lang bei 37° C bebrütete Leb.-Leb.-Bouillon- und Thioglykolat-Kulturen wurden einer Dampferhitzung von 100° C im Kochschen Dampftopf ausgesetzt, wobei die mit einer Stoppuhr festgestellten Erhitzungszeiten 1 bis 18 Min. betrugen.

Die Ergebnisse der Prüfung der Thermoresistenz der vegetativen Formen des *Cl. perfringens* bei unterschiedlichem Medium sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Dabei bedeuten die eingetragenen Zahlen die längsten Zeiten in Minuten, welche die Keime bei der Erhitzung noch überstanden. Zählungen der Keime vor und nach Erhitzung wurden nicht vorgenommen, so daß die Ergebnisse keine Schlußfolgerungen darüber zulassen, in welchem Maße es durch die Erhitzung zu einer Keimzahlreduktion gekommen war.

Tabelle 7: Ergebnisse der Hitzeresistenz von in 2 Medien gewachsenen Cl. perfringens-Stämmen A - F

Bezeichnung der Stämme	Überlebensfähigkeit der LLB-Kulturen gegenüber 100° C in Min.	Überlebensfähigkeit der Thioglykolat-Kulturen gegenüber 100° C in Min.
A CN 3920	7	5
A 3624	1	2
A 1048	3	3
A 817	1	3
A 172	1	5
A 158	2	3
A 342	1	3
A Weizen III	2	2
A P 55	5	3
B CN 684	1	3
B 3626	7	5
C CN 3690	6	5
D CN 3683	5	5
D 175	1	1
E CN 5063	7	5
F CN 3754	11	18

Wie Tabelle 7 zeigt, ist die Hitzeresistenz eines Cl. perfringens-Stammes, der weder in Leb.-Leb.-Bouillon noch in Thioglykolat-Medium versport, und der unter gleichen Bedingungen in den beiden Medien gewachsen ist und erhitzt wurde, verschieden hoch. Die vegetativen Formen des Stammes Typ A CN 3920 widerstanden in Leb.-Leb.-Bouillon der Erhitzung bei 100° C 7 Min., während

die in Thioglykolat-Medium gewachsenen Keime diese Temperatur nur 5 Min. lang aushielten.

Erstaunlich hoch ist die Thermoresistenz des Stammes F CN 3754. In LLB überstanden die Keime eine 11 Min. lange und in Thioglykolat-Medium sogar eine 18 Min. lange Erhitzung bei 100° C.

Verschiedene, auf einer Traubenzucker-Blutagar-Platte gewachsene, mittelgroße Kolonien des Cl. perfringens-Stammes A P 55 wurden isoliert, auf Leb.-Leb.-Bouillon subkultiviert und 24 Std. lang bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden diese Kulturen der Erhitzung auf 100° C im Kochschen Dampftopf zwischen 1 und 6 Min. ausgesetzt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 8 verzeichnet.

Tabelle 8: Thermoresistenz von 3 verschiedenen Kolonien einer Stammkultur gegenüber 100° C

Bezeichnung des Stammes	Überlebensfähigkeit der LLB-Kulturen gegenüber 100° C in Min.
A P 55 I	1
A P 55 II	5
A P 55 III	1

Der Versuch zeigt, daß verschiedene Kolonien einer Stammkultur hinsichtlich ihrer Thermoresistenz variieren können. Die Varianten A P 55 I und A P 55 III überlebten jedenfalls die Erhitzung bei 100° C nur 1 Min., während die Variante A P 55 II dieser Erhitzung 5 Min. lang widerstand.

Die im ELLNER-Medium bei pH 7,8 und 8,5 produzierten Sporen wurden in der oben beschriebenen Weise der Erhitzung zwischen 1 und 13 Min. ausgesetzt. Die Ergebnisse der Hitzetests, die für jeden Stamm siebenmal durchgeführt

wurden und keine Unterschiede in der Überlebenszeit aufwiesen, sind in der Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Resultate der Erhitzungsteste der versporteten ELLNER-Kulturen bei unterschiedlichem pH

Bezeichnung der Stämme	Hitzeresistenz der versporteten Stämme bei pH 7,8 gegenüber 100° C in Min.	Hitzeresistenz der versporteten Stämme bei pH 8,5 gegenüber 100° C in Min.
A CN 3920	5	10
A 3624	3	7
A 1048	4	5
A 817	5	6
A 172	7	8
A 158	5	9
A 342	5	6
A Weizen III	2	3
A P 55	4	5
B CN 684	5	12
C CN 3690	1	6
D CN 3683	3	8
E CN 5063	2	4

Die im ELLNER-Medium bei pH 8,5 gebildeten Sporen überstehen eine Erhitzung bei 100° C um 1 bis 7 Min. länger, als die bei pH 7,8 gebildeten Sporen. Die größten Differenzen in der Thermoresistenz zeigen die Cl. perfringens-Stämme Typ A CN 3920 (5 Min.) und Typ B CN 684 (7 Min.). Der Stamm B CN 684 wies bei pH 8,5 die höchste Hitze-resistenz von allen geprüften Stämmen auf. Seine Sporen widerstanden der Erhitzung bei 100° C 12 Min. lang. Die

Cl. perfringens-Stämme Typ B 3626 und Typ D 175 bildeten im ELLNER-Medium bei pH 7,8 keine Sporen, hingegen aber bei pH 8,5. Der Stamm F CN 3754 produzierte in diesem Medium bei beiden pH-Werten keine Sporen.

Analog zu den vorangegangenen Thermoresistenzprüfungen wurden die 3 zuletzt genannten Stämme im ELLNER-Medium von unterschiedlichem pH der Erhitzung bei 100° C zwischen 1 und 7 Min. lang ausgesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt, und die Resultate der Hitzeresistenzprüfung sind dort in Klammern gesetzt, wo die getesteten Stämme nicht versporteten.

Tabelle 10: Hitzeresistenz von versporteten und nicht versporteten Cl. perfringens-Stämmen im ELLNER-Medium von pH 7,8 und 8,5

Bezeichnung der Stämme	Hitzeresistenz der unversporteten Stämme bei pH 7,8 gegenüber 100° C in Min.	Hitzeresistenz der unversporteten u. versporteten Stämme bei pH 8,5 gegenüber 100° C in Min.
B 3626	(2)	6
D 175	(1)	2
F CN 3754	(4)	(7)

Die von den Stämmen B 3626 und D 175 bei pH 8,5 gebildeten Sporen widerstanden der Erhitzung 6 und 2 Min. lang, während die vegetativen Formen bei pH 7,8 des Mediums Hitzeresistenzen von 2 und 1 Min. aufwiesen.

Der Stamm F CN 3754, der bei beiden pH-Werten keine Sporen bildete, überlebte bei pH 7,8 4 und bei pH 8,5 7 Min. lang.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Hitzeresistenzteste:

1. Wie aus den Ergebnissen der Überlebensfähigkeit der Sporen bei Erhitzung auf 100°C deutlich hervorgeht, hat die Reaktion des Mediums einen wesentlichen Einfluß auf die Thermoresistenz der Sporen. Das stärker alkalisierte ELLNER-Medium mit einem pH von 8,5 bewirkte eine Steigerung der Resistenz der Sporen gegenüber einer Erhitzung von 100°C .
2. Die von HALL et al. (14) und anderen getroffene Feststellung, daß die Thermoresistenz von Sporen gleicher Stämme, die in verschiedenen Medien gebildet wurden, unterschiedlich hoch ist, trifft auch, wie die Ergebnisse der hier wiedergegebenen Versuche zeigen, für die vegetativen Formen zu, die in verschiedenen Medien gewachsen waren und erhitzt wurden.
3. Eine Korrelation zwischen stark versporenden Perfringens-Stämmen und geringer Hitzeresistenz und gering versporenden Stämmen und hoher Resistenz gegenüber 100°C , die HALL et al. (14) beobachteten, kann durch eigene Untersuchungen nicht bestätigt werden.

B e s p r e c h u n g

Zur Feststellung der Sporen von *Cl. perfringens*-Stämmen in bebrüteten Kulturen sind von früheren Autoren viele Möglichkeiten mikroskopischer und kultureller Art angegeben worden. BETHGE (3) bevorzugte die mikroskopische Untersuchung des nach GRAM gefärbten Ausstrichs, um in seinen Kulturen "mit großer Sicherheit" Sporen nachzuweisen. GIBBS und HIRSCH (12) und DUNCAN und STRONG (7) wendeten die 20 minütige Erhitzung ihrer versporteten Kulturen bei 75° C an (womit sie alle vegetativen Formen abtöteten) und strichen bestimmte Mengen des sporentragenden Mediums auf SPS-Agar aus, um nach bestimmter Inkubationsdauer die Zahl der produzierten Sporen pro ml an Hand der gebildeten Kolonien zu bestimmen.

Die in dieser Arbeit angewandte Methodik des Ausstrichs von 0,2 ml einer aktiven, 5 Min. lang geschüttelten ELLNER-Kultur auf einen gefelderten Objektträger (2,5 x 3,5 cm²) und der direkten mikroskopischen Zählung der Sporen in 10 Gesichtsfeldern nach RAKETTE-Färbung hat sich auf Grund wiederholter Untersuchungen, die etwa zu gleichen Ergebnissen führten, als hinlänglich genau erwiesen. Vor allem ist es mit der RAKETTE-Färbung, die im Gegensatz zur GRAM-Färbung ein mikroskopisch sehr gut differenziertes Bild liefert, möglich, die wenigen Sporen schlecht versporender *Cl. perfringens*-Stämme leicht festzustellen. Aus diesem Grunde wird der RAKETTE-Färbung gegenüber der GRAM-Färbung der Vorzug gegeben.

Cl. perfringens ist einheitlich von fast allen Autoren als ein Keim beschrieben worden, der nur unter besonderen Nährsubstanzverhältnissen Sporen bildet. Die Stämme des *Cl. welchii* versporen jedoch nicht einheitlich stark oder gering, sondern sind in ihren vom Medium abhängigen sporogenen Eigenschaften von Stamm zu Stamm, auch bei gleichem Typus, stark different.

Lange Zeit wurde die Anwesenheit von Kohlehydraten, wie Stärke, Saccharose, Maltose, Dextrose und anderen Zuckern im Sporulationsmedium für das Fehlen oder die Hemmung der Sporogenese verantwortlich gemacht (FITZGERALD (10), NOGOUCHI (31), SIMONDS (40), ROBERTSON (37), ZEISSLER (48) u.a.). Spätere Autoren (z.B. BETHGE (3)) benutzten konventionelle Nährböden, wie Rindfleischbouillon, Hirnbouillon und Serum-Aszitesbouillon unter Zusatz von Dextrose. Durch Ausgleich mit einer entsprechenden Alkalizugabe erzielte BETHGE (3) befriedigende Sporulationsergebnisse bei seinen Stämmen vom Typ A. HARDWICK, GUIRARD und FOSTER (16) postulierten sogar die Zugabe von Stärke zum Sporulationsmedium, um Antisporulationsfaktoren (ASF), wie z.B. gesättigte Fettsäuren, die beim Wachstum der vegetativen Formen oder beim Autoklavieren aus Peptonen, Lipoproteiden, Phospholipiden u.a. Strukturen frei gesetzt werden, als Adsorbens zu binden.

ELLNER (9) ist zum ersten Mal die Konstitution von Substanzen zu einem komplexen synthetischen Medium gelungen, mit dem er regelmäßig hohe Sporulationsraten bei 138 untersuchten Cl. perfringens-Stämmen Typ A erzielte. Das Medium setzte sich zusammen aus Polypeptonen (BB₁), Hefeextrakt, Stärke, MgSO₄, KH₂PO₄ und Na₂HPO₄ x 7 H₂O und war eingestellt auf den pH von 7,8.

Von mir durchgeführte Vorversuche, mit alkalisierter Leb.-Leb.-Bouillon (pH 8,0) unter Pufferzusatz von 5 % Na₂HPO₄ x 12 H₂O eine Sporulation zu induzieren, hatten keinen Erfolg.

Mit dem ELLNER-Medium jedoch gelang es dann, bei vielen der 16 untersuchten Cl. perfringens-Stämme hohe Sporenerträge zu erzielen. Dabei wurde evident, daß die Art des verwendeten Vermehrungsmediums eine nicht unbedeutende Rolle spielt, denn die Überimpfung von 16, 20 und 24 Std. lang inkubierten Leb.-Leb.-Bouillon-Kulturen auf das

ELLNER-Medium führte zu keinen positiven Resultaten. Erst die Inokulation von 8 - 12 Std. lang bei 37° C bebrüteten Thioglykolat-Kulturen brachte bei 3 Cl. perfringens-Stämmen schon nach 24-stdg. Inkubation bei Brutschranktemperatur hohe Sporenerträge von 70 - 96 %, z.B. bei Stamm Typ A CN 3920, A P 55, A 158, während andere Stämme, wie Typ A 817, A 342, A 3624 und Typ C CN 3690 nur spärliche Sporenraten von 0,6 - 5 % nach 1-tägiger Bebrütungs-dauer bei pH 7,8 zeigten.

Im Gegensatz zu ELLNER (9), der bei allen seinen A-Stämmen hohe Sporenerträge beobachtete, konnten in eigenen Untersuchungen nur bei 5 von 9 getesteten A-Stämmen sehr gute Sporulationsergebnisse erzielt werden. Keine Sporen bildeten die Stämme Typ B 3626 und Typ D 175 und auch Stamm A Weizen III zeigte nur nach 48-stdg. Bebrütung Sporenzahlen von 0,1 %, sporulierte sonst aber nicht.

Augenscheinlich hat die H-Ionenkonzentration des Mediums einen erheblichen Einfluß auf die Sporulationsaktivität mancher Stämme. Besonders die bei pH 7,8 gering oder gar nicht versporenden Stämme wiesen bei pH 8,5 einen Anstieg der Sporenerträge auf. Der sporulationsfördernde Effekt des stärker alkalisierten ELLNER-Mediums war auffällig bei den Stämmen Typ A 3624, A Weizen III, A 1048, Typ B 3626, Typ D 175, D CN 3683 und Typ E CN 5063, während die Stämme Typ B CN 684 und Typ C CN 3690 geringgradig höhere Sporenmengen bei pH 7,8 als bei pH 8,5 aufwiesen.

Der Versuch der Induktion einer Sporulation bei Stamm Typ F CN 3754 im ELLNER-Medium bei pH 7,8 und 8,5 mißlang.

Die in der Literatur angegebenen optimalen H-Ionenkonzentrationen für die Sporulation von Cl. perfringens sind nicht einheitlich. Übereinstimmend stellen jedoch alle Autoren fest, daß die Sporogenese nur im alkalischen Milieu, niemals aber bei Anwesenheit von freier Säure

stattfindet (SIMONDS (40), TORREY et al. (44), ZEISSLER (48), BETHGE (3) u.a.). ELLNER (9) befand diesen pH von 7,8 als optimal, während BETHGE (3) einen pH-Wert von 7,2 für seine Medien empfahl.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studien wird ersichtlich, daß eine maximale Sporulation nur bei optimalem pH-Wert des Mediums erfolgen kann. Die für die Sporogenese von *Cl. perfringens*-Stämmen günstigste H-Ionenkonzentration scheint aber für jedes Sporulationsmedium und jeden Stamm verschieden zu sein.

Über die Lage der Sporen im Bazillenleib und über deren Morphologie liegen von Seiten der Autoren auseinandergehende Beschreibungen vor. SIMONDS (40) u.a. schildern sie als zentral oder subterminal gelegene ovoide Gebilde, während MUSCATELLO (30) und MELIKOV (28) die Lage der Sporen als "nahe an einem Ende, aber nie endständig" beschreiben.

Übereinstimmend mit den Befunden von HALL et al. (14) und DUNCAN und STRONG (7) zeigten die eigenen Untersuchungen starke Diskrepanzen in der Morphologie der im ELLNER-Medium gebildeten Sporen. Der Stamm Typ A 1048 z.B. wies blasenförmige, mehr rundliche als ovale Gebilde auf, die den Bakterienleib zentral erheblich auftrieben, während der Stamm Typ A P 55 ovoide, kleine und mehr subterminal gelegene Sporen bildete, die nur wenig den Bazillenleib hervorwölbten.

Die Hitzeresistenz von *Cl. perfringens* wird von vielen Autoren sehr unterschiedlich bewertet. Während SIMONDS (40) und PREVOT (35) angeben, daß die Sporen ihrer Stämme nur einer 5 Sek. langen Einwirkung einer Temperatur von 99,5° C widerstanden (kochendes Wasser), finden BETHGE (3) und HALL et al. (14) Resistenzwerte der Sporen bis zu 90 Min. gegenüber 100° C. Die beiden zuletzt genannten Autoren geben auch an, daß eine Relation zwischen der Thermoresistenz der Sporen und dem Medium besteht, in dem sie gebildet wurden. HALL et al. (14) untersuchten

die Hitzeresistenz von Sporen gleicher Cl. perfringens-Stämme, die in 4 verschiedenen synthetischen Sporulationsmedien gebildet worden waren. Sie fanden stark differierende Resistenzen der Sporen gegenüber einer Erhitzung bei 100° C.

Übereinstimmend mit anderen Autoren (HALL et al. (14), DUNCAN und STRONG (7)) kann festgestellt werden, daß die Hitzeresistenz der im ELLNER-Medium produzierten Sporen nicht sehr groß ist. Nur die Stämme Typ A CN 3920 und Typ B CN 684 widerstanden der Erhitzung bei 100° C im Dampftopf 10 und 12 Min. lang. Auffallend jedoch ist die unterschiedliche Thermoresistenz der geprüften Stämme bei differenten pH-Werten des für die Suspendierung der Sporen verwendeten Mediums. Hier zeigte sich, daß die bei pH 8,5 gebildeten Sporen der Erhitzung um eine oder mehrere Minuten länger widerstanden als die bei pH 7,8 entstandenen.

Die Abhängigkeit der Thermoresistenz der 16 untersuchten Stämme von dem Medium, in dem sie gewachsen sind, wurde auch bei den vegetativen Formen offenbar. Hier zeigten die Thioglykolat-Kulturen andere Hitzeresistenzen als die in Leb.-Leb.-Bouillon gebildeten Keime. Alle getesteten Stämme widerstanden einer Erhitzung bei 100° C mindestens 1 Min. lang. Eine auffallend hohe Resistenz zeigte der Stamm Typ F CN 3754, der unversport die Erhitzung bei 100° C in Leb.-Leb.-Bouillon 11 Min. und in Thioglykolat-Medium 18 Min. lang überlebte.

DUNCAN und STRONG (7) postulieren für optimale Sporengermination einen Hitzeschock. Sie wendeten für diesen Zweck Temperaturen von 75° C für 20 Min. an. In dieser Zeit waren alle vegetativen Formen abgetötet. Bei eigenen Studien an 9 A-Stämmen und 1 F-Stamm zeigte sich jedoch, daß die vegetativen Formen aller Stämme 20 Min., 7 A-Stämme 25 Min. und der F-Stamm sogar 30 Min. lang einer Temperatur von 75° C widerstanden.

In Übereinstimmung mit DUNCAN und STRONG (7) begründen die größeren Unterschiede in der Thermoresistenz der einzelnen *Cl. perfringens*-Stämme die Annahme, daß die Eigenschaft der Hitzeresistenz genetisch determiniert ist, dabei aber auch Art und pH-Wert des Mediums einen Einfluß ausüben.

Inwieweit die Resistenz gegenüber einer Erhitzung auf 100° C von der Fähigkeit zur Sporulation der Stämme abhängt, läßt sich nicht klar beantworten. Lediglich für den Stamm F CN 3754 trat bei den eigenen Untersuchungen hervor, daß er nicht sporulierte und daher seine Hitzeresistenz eine an die vegetativen Formen gebundene Eigenschaft war.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Das ELLNER-Medium eignet sich, die Sporulation bei Stämmen des Cl. welchii zu induzieren. Die Sporulationsrate betrug bei Verwendung dieses Mediums bei einzelnen Stämmen 70 - 90 % und konnte durch Alkalisierung des Mediums (pH = 8,5) noch verbessert werden.
2. A-, B-, C-, D- und E-Stämme verhielten sich hinsichtlich der Sporogenese im ELLNER-Medium verschieden. Unter 9 A-Stämmen wurden 2 A-Stämme festgestellt, die sehr gering oder überhaupt nicht sporulierten. 1 F-Stamm konnte auch bei Verwendung des ELLNER-Mediums mit einem pH von 8,5 nicht zur Sporulation gebracht werden.
3. Bei der Erkennung der Sporen unter den vegetativen Formen leistete die RAKETTE-Färbung sehr gute Dienste. Dies galt insbesondere bei den Welchii-Stämmen, die nur wenige Sporen hervorbrachten.
4. Die Hitzeresistenz der Stämme des Cl. welchii ist von dem Medium, in dem die Keime vermehrt und erhitzt werden, sowie von dem pH des Mediums abhängig. Sie ist außerdem eine Eigenschaft der einzelnen Stammtypen und ihrer Varianten und scheint genetisch determiniert zu sein.

Eine bemerkenswerte Hitzeresistenz wies ein F-Stamm auf, der nicht sporulierte.
5. Die Frage, ob die Hitzeresistenz durch die Sporulationsfähigkeit der Welchii-Stämme beeinflusst wird, konnte nicht schlüssig beantwortet werden. Bei den F-Stämmen kann die Hitzeresistenz als eine Eigenschaft der vegetativen Formen angesehen werden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Angelotti, R., Quantitation of Clostridium perfringens in foods
H.E. Hall,
M.J. Foter u.
K.H. Lewis Appl.Microbiol. 10, 193 (1962)
2. Barnes, E.M., The behaviour of a food poisoning
J.E. Despaul u.
M. Ingram strain of Clostridium welchii in
beef
J.Appl.Bact. 26, 415 (1963)
3. Bethge, J. Die Versporung des Fraenkelschen Gas-
 bacillus (Bac. welchii Typ A, Bac.
 perfringens) in künstlichen Kulturen
Arch.Hyg. 127, 452 (1947)
4. Campbell, L.L.(jr.)u. Nutritional requirements of some
A.F. Hilmer putrefactive anaerobic bacteria
J.Bact. 71, 267 (1955)
5. Collee, J.G., Studies on the growth, sporulation
J.A. Knowlden u.
B.C. Hobbs and carriage of Clostridium welchii
 with special reference to food
 poisoning strains
J.Appl.Bact. 24, 326 (1961)
6. Despaul, J.E. Food poisoning microorganisms. A
 study of characteristics and methods
 of detection with particular emphasis
 on Clostridium perfringens
Chicago Ill. (1963) Defense Substi-
 tence Supply Center
7. Duncan, C.L. u. Improved medium for sporulation of
D.H. Strong Clostridium perfringens
Appl.Microbiol. 16, 82 (1968)
8. Dunham, E.K. Report of five cases of infection
 by the Bacillus aerogenes capsulatus
 (welchii)
Bull.Johns Hopkins Hosp. 8, 68 (1897)
9. Ellner, P.D. A medium promoting rapid quantitative
 sporulation in Clostridium perfringens
J.Bact. 71, 495 (1956)
10. Fitzgerald, M.P. The induction of sporulation in the
 bacilli belonging to the aerogenes
 capsulatus group
J.Path.Bact. 15, 147 (1910)

11. Foster, J.W.,
W.A. Hardwick u.
B. Guirard
Antisporulation factors in complex organic media. I. Growth and sporulation studies on bacillus larvae
J.Bact. 59, 463 (1950)
12. Gibbs, B. u.
A. Hirsch
Spore formation by Clostridium perfringens (welchii) in four laboratory media
J.Appl.Bact. 19, 308 (1956)
13. Groom, R.A. u.
D.H. Strong
Sporulation of Clostridium perfringens (welchii) in four laboratory media
J.Appl.Bact. 29, 308 (1966)
14. Hall, H.E.,
R. Angelotti,
K.H. Lewis u.
M.J. Foter
Characteristics of Clostridium perfringens strains associated with food and food-borne disease
J.Bact. 85, 1094 (1963)
15. Hallmann, L.
Bakteriologie und Serologie
Thieme, Stuttgart 1961
16. Hardwick, W.A.,
B. Guirard u.
J.W. Foster
Antisporulation factors in complex organic media. II. Saturated fatty acids as antisporulation factors
J.Bact. 61, 145 (1951)
17. Hartwigk, H. u.
P. Tzimas
Die Züchtung von Anaerobiern auf Traubenzuckerblutagar mit "Anoxydator"-Scheiben
Dtsch.tierärztl.Wschr. 70, 537 (1963)
18. Haynes, W.C. u.
L.J. Rhodes
Spore formation by bacillus popilliae in liquid medium containing activated carbon
J.Bact. 91, 2270 (1966)
19. Headlee, M.R.
Thermal death point. III. Spores of Clostridium welchii
J.Infect.Dis. 48, 468 (1931)
20. Herter, C.A.
On bacterial processes in the intestinal tract in some cases of advanced anaemia with special reference to infection with B. aerogenes capsulatus (B. welchii)
J.biol.Chem. 2, 1 (1906)
21. Hitzman, D.O.,
O.H. Halvorson u.
T. Ukita
Requirements for production and germination of spores of anaerobic bacteria
J.Bact. 74, 1 (1957)

22. Hobbs, B.C. Clostridium welchii as a food poisoning organism
J.Appl.Bact. 28, 74 (1965)
23. Kim, C.H., R. Cheney u. M. Woodburn Sporulation of Clostridium perfringens in a modified medium and selected foods
Appl.Microbiol. 15, 871 (1967)
24. Leifson, E. Bacterial spores
J.Bact. 21, 331 (1931)
25. Lund, A.J. Investigation of factors influencing food sterilization and preservation. Sporulation of the genus Clostridium Annual Report of the Hormel Inst. Univ. of Minnesota, p. 88 (1955/56)
26. Lund, A.J., F.W. Janssen u. L.E. Anderson Effect of culture filtrates on sporogenesis in a species of Clostridium
J.Bact. 74, 577 (1957)
27. Mager, J., S.H. Kindler u. N. Grossovicz Nutritional studies with Clostridium parbotulinum type A
J.Gen.Microbiol. 10, 130 (1954)
28. Melikov, L. u. K. Ostrovsky Zit. nach 3. Bethge, J.
C.r.Soc.Biol. 74, 227 (1914)
29. Midura, T.F., L.L. Kempe, J.T. Graikoski u. N.A. Milone Resistance of Clostridium perfringens type A spores to γ -radiation
Appl.Microbiol. 13, 244 (1965)
30. Muscatello, G. u. C. Gangitano Zit. nach 3. Bethge, J.
Münch.med.Wschr. (1900) II, 1303
31. Nogouchi, H. Zit. nach 44. Torrey, J.C. et al.
Proc.N.Y.Path.Soc. 7, 196 (1907)
32. Parish, W.E. Necrotic enteritis in the fowl. II. Examination of the causal Clostridium welchii
J.Comp.Path. 71, 394 (1961)
33. Perkins, W.E. u. K. Tsuji Sporulation of Cl. botulinum. II. Effect of arginine and its degradation products on sporulation in a synthetic medium
J.Bact. 84, 86 (1962)
34. Powell, J.F. u. R.E. Strange Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores
Biochem.J. 54, 205 (1953)

35. Prévot, A.R. Biologie des maladies dues aux
anaérobies
Flammarion, Paris 1955
36. Reploh, H. u.
H.-J. Otte Lehrbuch der Medizinischen
Mikrobiologie
G. Fischer, Stuttgart 1965
37. Robertson, M. Notes upon certain anaerobes iso-
lated from wounds
J.Path.Bact. 20, 327 (1916)
38. Schneider, M.D.,
N. Grecz u.
A. Anellis Sporulation of Clostridium botuli-
num types A, B, and E, Clostridium
perfringens and putrefactive
anaerobe 3679 in dialysis sacs
J.Bact. 85, 126 (1963)
39. Shull, G.M.,
R.W. Thoma u.
W.H. Petersen Amino acid and unsaturated fatty
acid requirements of Clostridium
sporogenes
Arch.Biochem. 20, 227 (1949)
40. Simonds, J.P. Zit. nach 44. Torrey, J.C. et al.
Monogr.Rockefeller Inst.med.Res.
No. 5 (1915)
41. Stableforth, D.W.u.
J.A. Galloway Infectious diseases of animals.
Diseases due to bacteria, Vol. I
Butterworths, London 1959
42. Stewart, B.T. u.
H.O. Halvorson Studies on the spores of aerobic
bacteria. I. The occurrence of
alanine racemase
J.Bact. 65, 160 (1953)
43. Sugiyama, H. Studies on factors affecting the
heat resistance of spores of
Clostridium botulinum
J.Bact. 62, 81 (1951)
44. Torrey, J.C.,
M.C. Kahn u.
M.H. Salinger The influence of H-ion concentration
on the sporulation of B. welchii
J.Bact. 20, 85 (1930)
45. Welch, H.W. u.
G.H.F. Nuttal A gas producing bacillus
Bull.Johns Hopkins Hosp. 3, 81 (1892)
46. Willis, A.T. Anaerobic bacteriology in clinical
medicine
Butterworths, London 1960
47. Yamagishi, T.,
S. Ishida u.
J. Nishida Isolation of toxogenic strains of
Clostridium perfringens from soil
J.Bact. 88, 646 (1964)

48. Zeissler, J. Handbuch der pathogenen Mikro-
organismen von Kolle-Kraus-
Uhlenhuth
Urban & Schwarzenberg, Wien 1930,
Bd. 10, S. 35
49. Zeissler, J., Die Gasödeme des Menschen
C. Krauspe u. Bd. I, Steinkopf, Darmstadt 1958
L. Rassfeld-Sternberg
50. Zoha, S.M.S. u. Production of spores by a putre-
H.L. Sadoff factive anaerobe
J.Bact. 76, 203 (1958)

Für die Überlassung des Themas und für die mir jederzeit gewährte großzügige Unterstützung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Hartwig herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts sei für die gewährte Unterstützung ebenfalls gedankt.

Lebenslauf

Am 6. Januar 1942 wurde ich als Sohn des Studienrates Hans Schick und seiner Ehefrau Anneliese geb. Schlaack in Berlin-Kreuzberg geboren.

Von 1947 bis 1953 absolvierte ich die Grundschule in Berlin-Tiergarten. Anschließend besuchte ich das Menzel-Gymnasium in Berlin.

Nach Ablegung des Abiturs wurde ich im Sommersemester 1961 an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. 1964 bestand ich das Physikum und im November 1967 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

Die Praktikantenzeit habe ich an der Klinik für Klauentierkrankheiten und Tiergeburtshilfe der Freien Universität Berlin absolviert.

